

# Metody používané v klinické praxi

- Metody využívající sérologické reakce
  - exkurze TEST-LINE firma
- Testy funkce a počtu buněk imunitního systému
  - přednáška VÚVI
- Základy alergologického vyšetření
- Imunologické vyšetření a základy interpretace výsledků imunologických laboratoří
  - exkurze ve firmě Bioplus?
- Příklad vyšetření v laboratořích

# metody využívající sérologické reakce

## A. Precipitační metody

V kapalinách, v gelu

## B. Imunodifuzní metody

- Jednoduchá imunodifúze
- dvojitá imunodifúze

## C. Imunoelektroforetické metody

**Kombinace s elfo**

- Imunoelektroforéza podle Williamse a Grabara, Raketová imunoelektroforéza, Protisměrná, Dvojrozměrná

- **D. Aglutinační metody**

**E. Hemaglutinační**

**F. Komplementové**

**G. Metody fagocytózy**

## H. Immunoblotting – TeST-LINE

Zákalové reakce

- Imunonefelometrie
- Imunoturbidimetrie

## H. Imunochemické metody

a) RIA

b) FIA

c) EIA – TEST-LINE

# ***Časové rozdělení metod, metody používané v klinické praxi***

## **Metody I.generace**

- Některé techniky v roztoku – precipitační, aglutinační, HIT, KFR,

## **Metody II.generace**

- Kvantitativně i složité směsi antigenu,
- Imunodifúze, imunoelfo, latexová aglutinace

## **Metody III.generace**

- Velmi citlivé metody, stanoví Ag, Ab i hapteny
- Imunoanalýzy – př. RIA, FIA, EIA, imunoturbidimetrie
- – nefelometrie, -fluorimetrie (fluorescence), popř jejich kombinace

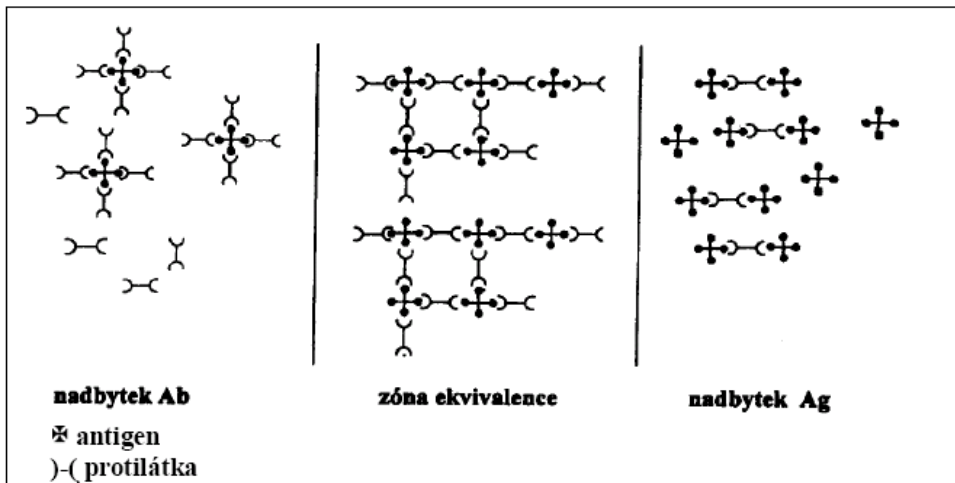
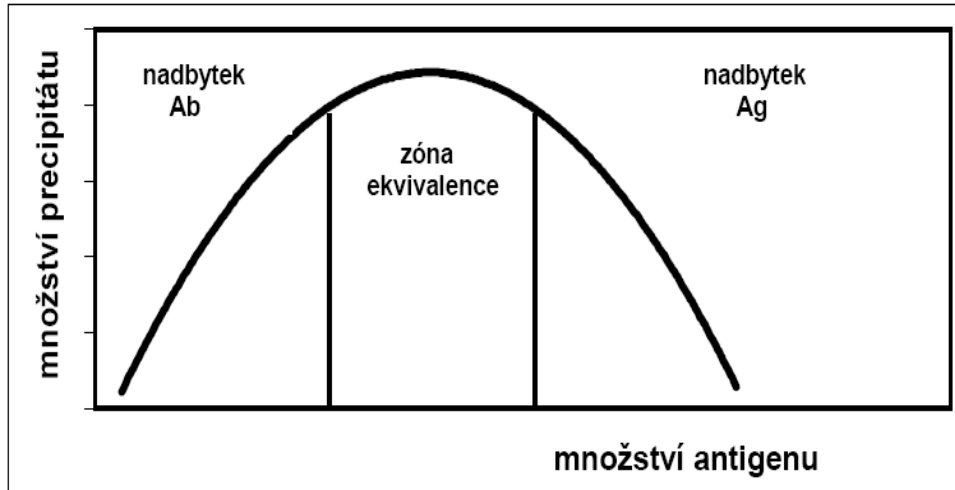
## **Metody IV.generace**

- Kontinuálně měří Ag, Ab i hapteny
- imunosenzory

- 1929 Heidelberg a Kendall – popsali reakci rozpustného Ag s odpovídající Ab ve vhodném poměru.
  - Výsledek reakce – precipitát
- Stanovili precipitační křivku a 3 oblasti reakce Ag s Ab

# Serologické metody - precipitace

Imunoprecipitační křivka (Ag – antigen, Ab – protilátka)



## Oblast ekvivalence

*Precipitační metody*

## Oblast nadbytku protilátky

*Nekompetitivní metody*

- zákalové nefelometrie  
turbidimetrie

- s markerem EIA, IRMA..

## Oblast nadbytku antigenu

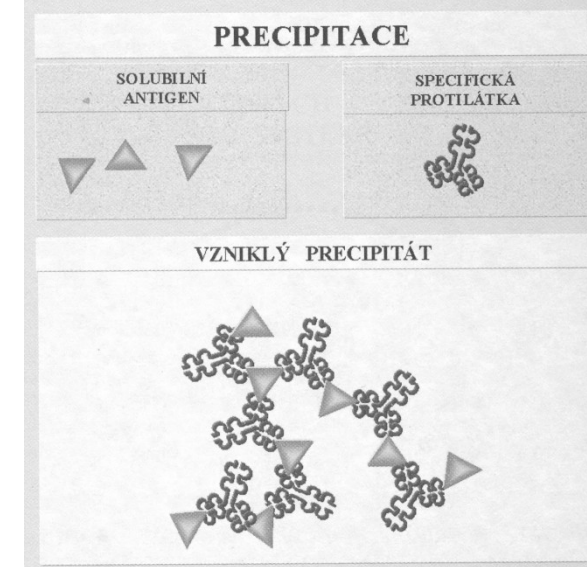
*Kompetitivní metody*

- heterogenní RIA, ELISA..
- homogenní EMIT...

- **faktory** ovlivňující precipitaci:

- typ **Ab** /např. IgG/
- **teplota** – se zvyšující se teplotou se urychluje precipitace /např. 38°C/
- **vzájemná koncentrace** Ag a Ab
- **pH**
- iontový **náboj**
- **tvar a velikost** částí

# PRECIPITAČNÍ metody:



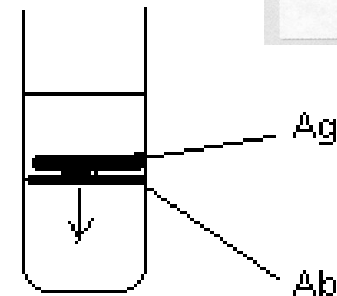
- $Ag + Ab \rightarrow Ag-Ab$
- *precipitinogen*    *precipitin*    *precipitát*    sraženina
- solubilní /rozpustný/

• - dělíme:

• A) v kapalinách :

• I. prstencová

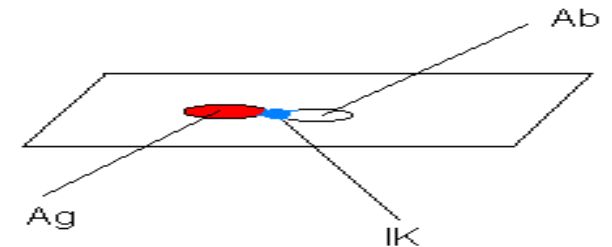
• – prstenec sraženiny precipitátu



• II. sklíčková – určení pod mikroskopem

• B) v gelu:

• **IMUNODIFÚZE**

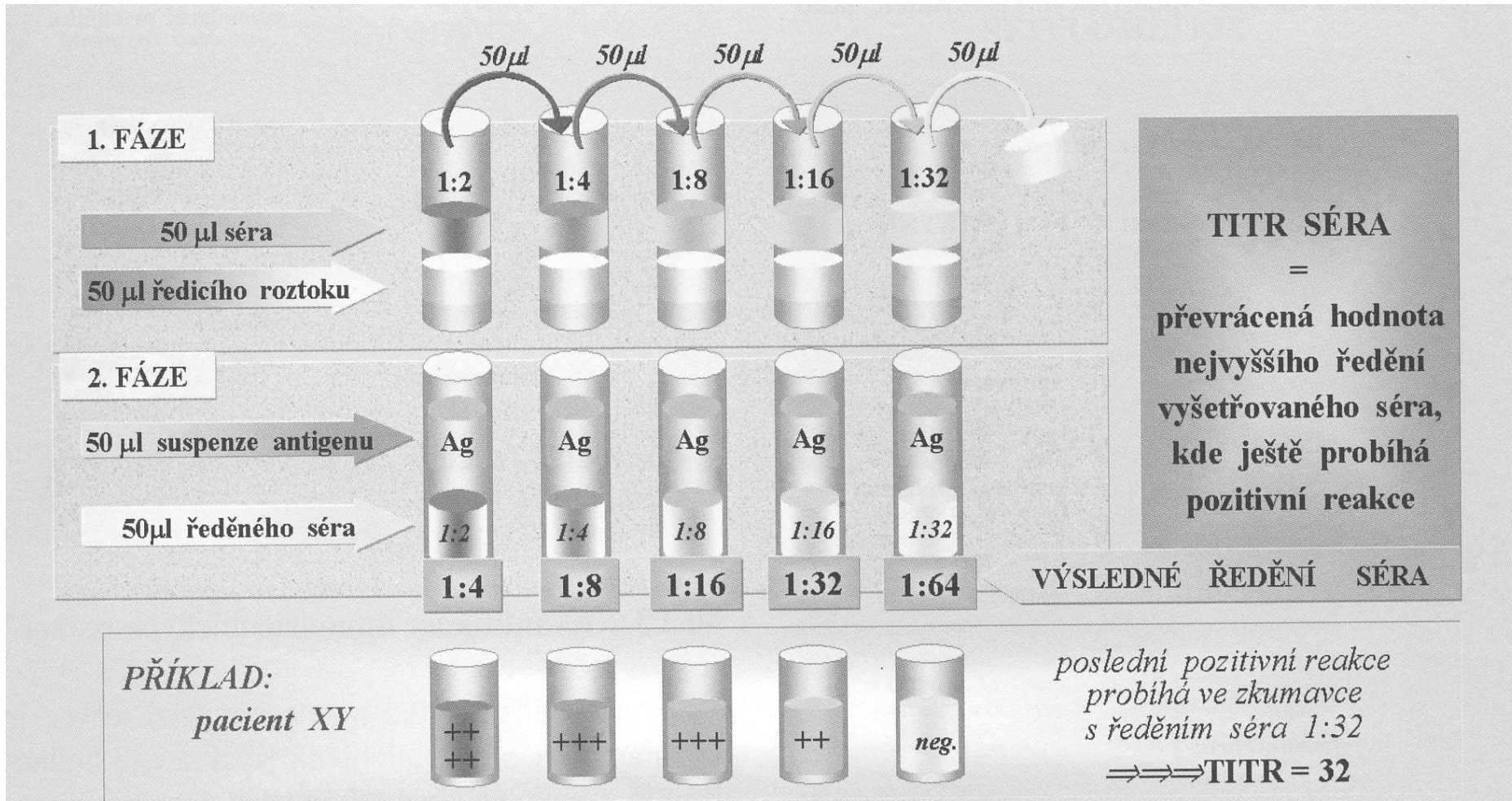


• *využití* : ke stanovení Ag, Ab, H

## **PRECIPITAČNÍ metody:**

- **praxe** – 1. zjištění výskytu či stanovení Ab v séru při inf. onemocnění 2. identifikace patogena
- Koncentrace Ab se vyjadřuje jako **TITR SÉRA**.
- => *nejmenší zředění Ab, které ještě reaguje s Ag*
- - hodnocení : **kvalitativně** – odečtení okem
- **kvantitativně** :
  - a, zjištěním **množství precipitátu**
  - b, zjištěním **množství Ag** v precipitátu či supernatantu
  - c, změna **optických vlastností** vzorku – 2 metody :
  - **NEFELOMETRIE –\* TURBIDIMETRIE**

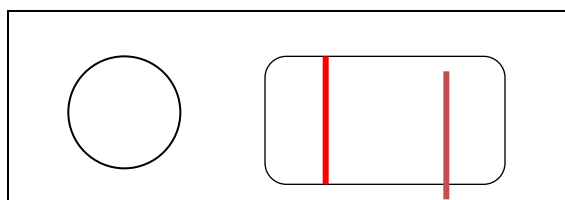
# Titrace séra





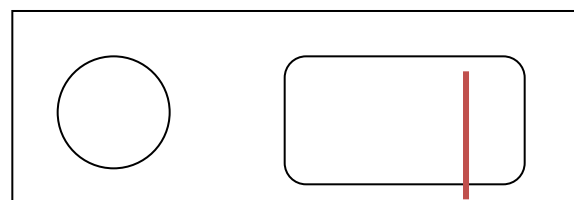
# př. Precipitační imunochemické metody

*Screeningové metody* – jednoduché precipitační testy  
terénní kazetové testy pracující v oblasti ekvivalence



S T C

Negativní výsledek



S T C

Pozitivní výsledek

Za nepřítomnosti nebo nedostatku drogy ve vzorku moče vytvoří protilátka imunokomplex (precipitát) se značenou drogou vázanou v místě testu T. (S – vzorek, C – kontrola)

**Využití:** Rychlé chromatografické testy – stanovení přítomnosti drogy v tělesných tekutinách, Ab nebo Ag u infekčních nemocí (Chlamydie, Adenovirus, Rotavirus), (*Helicobacter pylori*, Influenza A,B, Rota a Adenovirus)

# Imunodifúze

- specifická **reakce Ag s Ab - precipitace**

*/gel z agaru nebo agarózy/-* **AGAR** ~ směs polysacharidů extrahovaných z červených mořských řas

\* → přírodní agar nutno přečišťovat ~ **frakcionací** vznikají 2 složky: ● **agaróza**

- neobsahuje vedlejší aniontové skupiny - pro difúzi více vhodná

- *standardnější složení* než agar a nižší schopnost *nespecifické adsorpce*

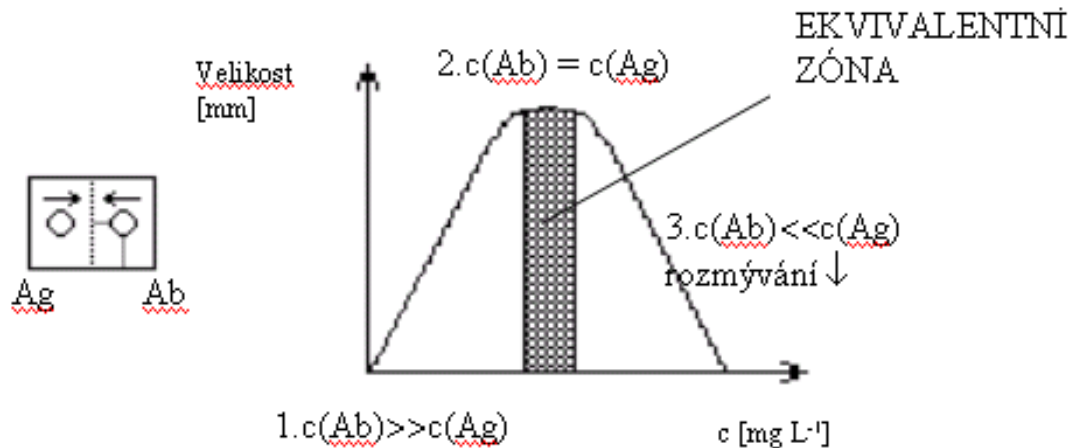
● **agaropektin**

- obsahuje aniontové skupiny → *pro difúzi nevhodný*

# imunodifúze

- - příprava gelu:
- rozvaření agarózy v pufru na vodní lázni
- nanesení na skleněné destičky – ztuhnutí ve vodorovné poloze /při teplotě pod 42°C/
- - princip ID:
- - vzájemná **volná difúze Ab a Ag** v gelu na základě **koncentračního spádu** až do místa střetnutí ~ zde vznikají **precipitační linie** → **obloučky** → **prstence** → **kruhy** /záleží na použitém materiálu/
- - vzniklé precipitáty **detekujeme**:
  - \* **okem** - zákal
  - \* **barvením** – Coomassie blue, amidočerň
  - \* **sekundárními protilátkami**
  - \* **Au, Ag, radioizotopy**
- vznik precipitátů je **děj postupný!!!**

# Imunodifúze



1. nejdříve vznikají rozpustné imunokomplexy (IK) – nedostatek Ag
2. po vyrovnání  $c(\text{Ab}) = c(\text{Ag})$  vznikají pevné IK – detekce sraženiny  
...EKVIVALENTNÍ ZÓNA
3. převaha Ag nad Ab ~ rozpad IK (Ag naráží na IK – rozmývání sraženiny)

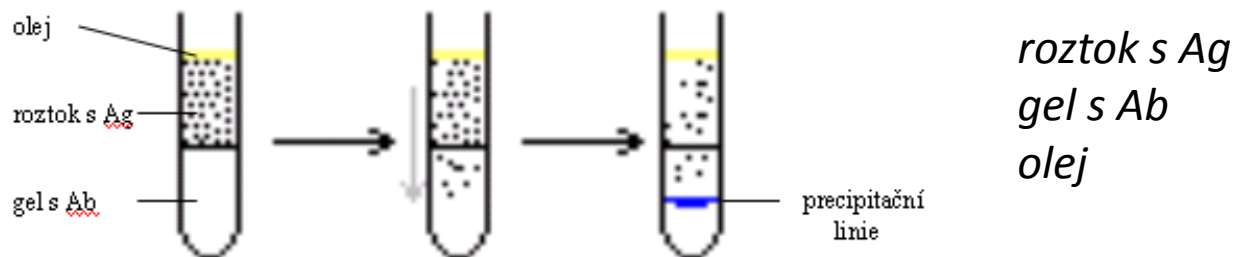
## - rozdělení imunodifúzních metod:

- \* jednoduchá imunodifúze – gelem difunduje pouze jedna složka – Ag nebo Ab
- \* dvojitá imunodifúze – gelem difundují obě složky – Ag i Ab
- jednorozměrná – složka putuje v gelu jedním směrem
- dvojezměrná /radiální/ – složka putuje více směry

Ag a Ab si neodpovídají – **nevytvoří se precipitační linie**

Směs více typů Ag a Ab – počet **linií** odpovídá **počtu** sobě si odpovídajících párů **Ab a Ag**

# Imunodifúze



- **jednoduchá imunodifúze** - migruje 1 složka:
- **1. složka** se smíchá s gelem už při jeho přípravě (nemigruje)
- **2. složka** se aplikuje následně do vyřezaných jamek – **MIGRUJE** – v místě vyrovnání koncentrací vzniká **precipitační linie**

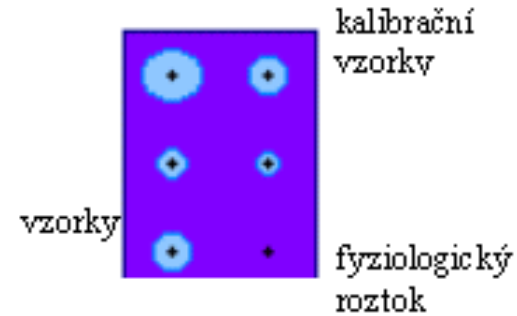
## Jednoduchá jednorozměrná imunodifúze ~ dle OUDINA

- - ve spodní části zkumavky agarózový gel s Ab, převrstveno roztokem s Ag - zalito parafínovým olejem – zábrana odpařování
- - čím je Ag koncentrovanější, tím dále od roztoku s Ag vznikají precipitační linie /odečitatelnější/
- - **využití:** • detekce počtu Ag párů

# Imunodifúze

## Jednoduchá radiální /dvojrozměrná/ imunodifúze dle MANCINIOVÉ

- - na skleněnou destičku se nalije gel, který obsahuje Ab → nemigruje
- inkubace ve vlhké komůrce ve vodorovné poloze → difúze všemi směry (radiální)
- *po obarvení - modré precipitační prstence*
- → čím je vzorek koncentrovanější – větší průměr prstence
- → změření druhé mocniny průměrů prstenců – vynesení kalibrační křivky a odečet koncentrace neznámého vzorku-
- využití:
  - ke **kvantitativnímu stanovení Ag**
- **klinická praxe: stanovení koncentrace IgG, IgA, IgM, IgD**, složek komplementu a proteinů akutní fáze

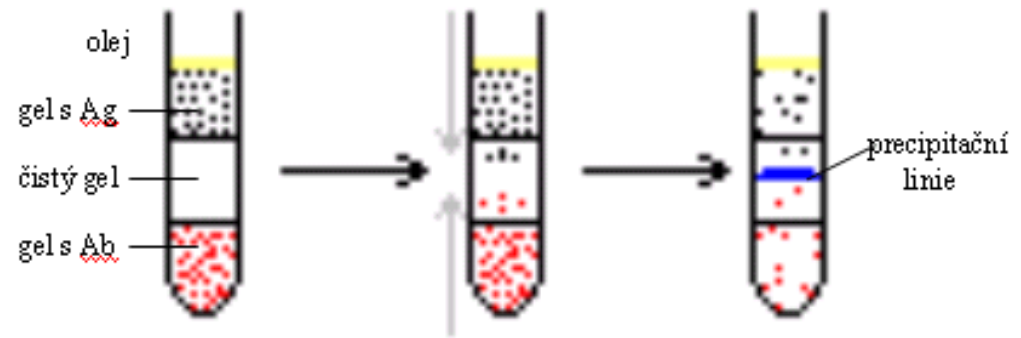


### jamky - vzorky:

-gel s Ab

- \* *fyziologický roztok* –blank
- \* *vzorky o neznámé koncentraci*
- \* *vzorky o známé koncentraci (kalibrační)*

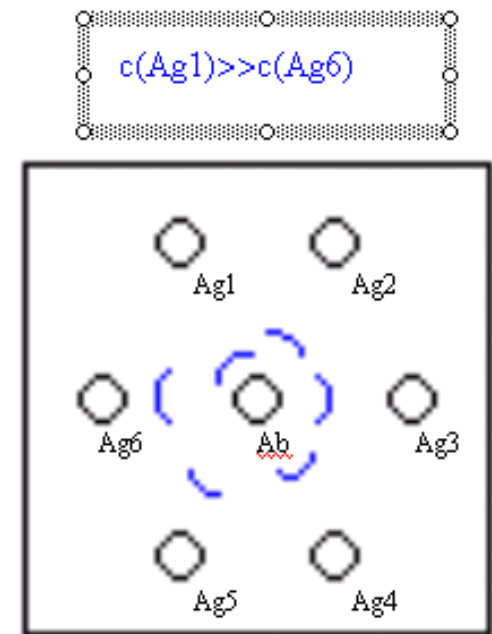
## Imunodifúze



- **dvojitá imunodifúze**
- - gelem *difundují obě složky*
- - *koncentrace Ag a Ab musí být vzájemně **ekvivalentní*** – proti překrývání linií
- **Dvojitá jednorozměrná imunodifúze**
- - ve zkumavce **agarózový gel s Ab** a agarózový gel s **Ag**
- - mezi nimi **čistý gel** – v místě vyrovnání koncentrací se vytvoří **precipitační linie**-
- *využití:* • **kvalitativní důkaz Ag**
- určení **imunochemické příbuznosti či odlišnosti Ag**

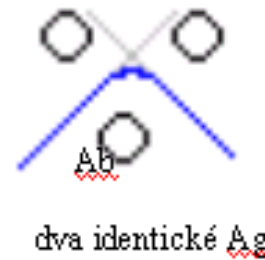
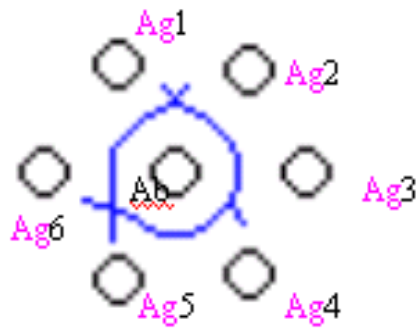
## Imunodifúze

- **Dvojitá radiální imunodifúze ~dle OUCHTERLONYHO**
- na *skleněné desky* nanesen **čistý gel**
- menší jamky – *různé Ag* či *různé koncentrace* jednoho Ag
- větší prostřední jamka – Ab
- koncentrovanější Ag → **precipitační obloučky** blíže jamky s Ab
- inkubace ve vlhké komůrce
- počet precipitačních linií odpovídá počtu odpovídajících si párů Ag a Ab
- **Využití** –průkaz Ab při alergických alveolitidách, průkaz Ab proti některým patogenům, např. *Toxoplasma gondii*





# Imunodifúze



1 a 2 částečně identické /některé determinanty navíc/

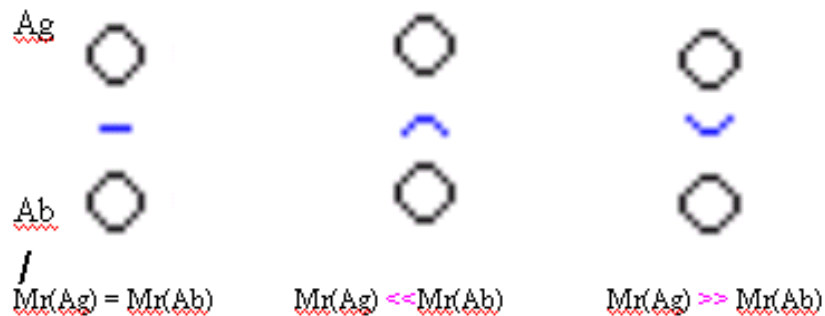
2 a 3 identické

3 některé determinanty navíc než 4

5 a 6 si neodpovídají

- - využití: Ag
- titrace Ag – **koncentrace**  
**Ag** určuje umístění precipitační linie
- důkaz **přítomnosti Ab**
- porovnávání **identity a neidentity Ag směsí** → umístění precipitační linie

porovnání  $M_r(\text{Ag})$  a  $M_r(\text{Ab})$  → určuje tvar precipitační linie



- menší molekula se dostane dále do gelu